动 物 学 研 究 2005, Dec. 26 (6): 638-644 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

中国林蛙婚垫的显微结构变化及其与睾酮的关系

杨 纯[1,2], 张育辉[1,*], 崔慧婷
(1. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062; 2. 山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041004)

摘要: 用光镜观察中国林蛙(*Rana chensinensis*)婚垫显微结构的年周期变化, 并对婚垫内的睾酮(T)和雄激素受体(AR)进行免疫细胞化学检测, 其结果表明: 婚刺的形成是由生发细胞增生、颗粒细胞数量增多和体积增大所致, 其消退是由角质细胞包裹的颗粒细胞小体脱落所致。婚腺发育与婚刺形成同步, 在林蛙婚配期间婚腺的分泌活动最旺盛。T和AR在颗粒细胞、生发细胞和婚腺内的分布与婚垫显微结构的变化周期一致, 说明婚垫的形成与消退受T调控。婚垫发育的变化周期与精子发生进程和精巢系数具相关性, 即婚垫的形态特征可间接反应精巢的发育状况。

关键词: 中国林蛙; 婚垫; 睾酮; 雄激素受体; 免疫细胞化学
中图分类号: Q959.53; Q492 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853 (2005) 06-0638-07

Correlation Between the Changes of Microstructure and Testosterone in Nuptial Pad of the Frog, *Rana chensinensis*

YANG Chun[1,2], ZHANG Yu-hui[1,*], CUI Hui-ting
(1. *College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China;*
2. *College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China*)

Abstract: The nuptial pad microstructures of *Rana chensinensis* in the Qinling Mountain China were observed by light microscopy during the annual reproductive cycle; meanwhile, testosterone (T) and androgen receptor (AR) localization were examined by immunocytochemistry in the nuptial pad. The results indicated that the formation of nuptial spines was caused by multiplication of germinal cells, granular cells, and volume expansion of granular cells. The regression of nuptial spines was caused by desquamation of granular cell globules, which wrapped by a layer of horny cells and detaching from epidermis surface. The development of nuptial glands synchronized with nuptial spines morphogenesis. Secretory activity of the nuptial glands was active during courtship. The distribution of T and AR in germinal cells, granular cells and nuptial glands showed a good agreement with aspection of microstructures in nuptial pad. These indicated that the formation and regression of nuptial pad were regulated by T. Seasonal variation in the development of nuptial pad were associated with testis somatic index and spermatogenesis progress. It suggested that pad morphological characters reflected indirectly the development condition of testis.

Key words: *Rana chensinensis*; Nuptial pad; Testosterone; Androgen receptor; Immunocytochemistry

婚垫是性成熟雄性蛙的第二性征, 婚刺的出现和婚腺的分泌活动对雄激素具有依赖性。尽管有证据表明婚腺与性行为, 尤其是婚配行为有关, 但婚腺分泌物的确切功能仍不甚清楚(Kurabuchi, 1993; Epstein & Blackburn, 1997; Emerson et al, 1999)。施加外源性雄激素能诱导豹蛙(*Rana pipiens*)婚垫的显微结构发生改变(Lynch & Blackbum, 1995), 而注射雌二醇(17β-estradiol, 17β-E_2)能抑制蓝点蛙(*R. cyanophlyctis*)间质细胞的分泌活动, 减少血清中睾酮的含量, 导致婚垫退化, 即表皮光滑、婚刺消失、婚腺的腺上皮退化(Saidapur & Nadkarni, 1975)。一些环境内分泌干

收稿日期: 2005-07-19; 接受日期: 2005-09-09
基金项目: 陕西省自然科学基础研究计划项目(2001SM26)
* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yu-huizhang@163.com

扰物（endocrine-disrupting contaminants，EDCs）能模仿 17β-E_2 的作用，通过与 17β-E_2 的受体结合，导致雄蛙雌性化（van Wyk et al，2003）。鉴于婚垫对雄激素的依赖性和高度敏感性，就能以婚垫显微结构的改变来监测 EDCs 对两栖类生殖内分泌活动的影响。

中国林蛙（*R. chensinensis*）是广布的两栖动物。Ye et al（1993）曾描述过中国林蛙婚垫的外形特征，其由四团瘤状物构成。近基部的两团较大，界限明显，表面有婚刺，其色泽随季节略有变化，但是有关年生殖周期中婚垫的显微结构变化与睾酮（testosterone，T）和雄激素受体（androgen receptor，AR）的关系，及其与精巢系数和精子发生的关系尚缺乏报道。本文以秦岭北坡的中国林蛙雄性成体为研究对象来揭示这种关系，为后继研究提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　切片的制备

中国林蛙雄性成体 72 只，雌性成体 24 只。从 2002 年 5 月到 2003 年 5 月隔月采于秦岭北坡、西安市长安区大峪水库附近的沟麓地带。每月实验用 8 只，其中雄性 6 只，雌性 2 只。毁髓处死，截取婚垫。取材后立即置入新配制的改良 Bouin's 液固定 24 h，常规石蜡切片，厚 5 ~ 8 μm，分别用于 H.E 染色和免疫细胞化学染色。

1.2　免疫细胞化学染色

采用 SABC 法进行免疫细胞化学反应。切片经脱蜡复水后，浸入新鲜配制的 3% H_2O_2 溶液中，室温处理 5 ~ 10 min 以灭活内源性酶，蒸馏水洗 2 min × 3 次。滴加复合消化液，室温 10 min，0.1 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次。正常山羊血清室温封闭 20 min，甩去血清，滴加第一抗体，分别为兔抗人 T 多克隆抗体（1∶2 500，Sigma 产品）和兔抗人 AR 多克隆抗体（1∶100，NeoMarkers 产品），4 ℃ 孵育 24 h，0.1 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次。第二抗体为即用型羊抗兔 IgG（Boster 产品），25 ℃ 孵育 30 min，0.1 mol/L PBS 洗 2 min × 3 次。再滴加 SABC 复合物（Boster 产品），室温孵育 20 min，0.1 mol/L PBS 洗 5 min × 4 次。最后用 DAB 显色 5 ~ 15 min，用 0.1 mol/L PBS 充分冲洗以终止反应。蒸馏水冲洗后，脱水、透明、中性树胶封片，光镜下观察、拍照。空白对照用 PBS 替代第一抗体进行免疫细胞化学染色。

1.3　T、AR 免疫反应阳性细胞的图像分析及统计学处理

染色后的切片在 Olympus BH-2 型光学显微镜下观察拍照。另外，用目镜测微尺测量婚腺腺泡的直径以及婚垫中其他细胞的大小。用 Qwin V3 图像分析系统（Lecia）分别测定 1 ~ 12 月婚垫的 T、AR 抗体免疫染色反应物的灰度值，每个材料选取 3 张切片，随机测试 30 个阳性细胞的灰度值。灰度分为 0 ~ 256 级，反映免疫阳性反应着色强弱。测量的灰度值越小，阳性反应越强。采用 SPSS 10.0 软件中的 Kolmogorov-Smirnov 检验所得实验数据符合正态分布后，再进行单因子方差分析（ANOVA）。实验结果以平均值 ± 标准误表示，取 $P < 0.01$ 作为差异显著性的界值。

2　结　果

2.1　婚垫的显微结构

中国林蛙婚垫（nuptial pad）位于雄性成体前肢第一指，由四团瘤状物构成。近基部的两团较大，界限明显，表面有婚刺，其色泽随季节略有变化。婚垫属于皮肤衍生物，由表皮和真皮构成。表皮基底层细胞呈立方状或矮柱状，排列紧密。表皮较薄，仅由 2 ~ 3 层细胞构成，胞核明显。基底层与角质层之间为颗粒细胞，胞核呈圆形或椭球形，由内向外逐渐变大。颗粒细胞内有大小不等的透明角质颗粒。真皮内有黑色素细胞和婚腺（nuptial glands）腺泡分布。中国林蛙婚垫的表皮厚度、婚刺突起的程度、婚腺腺泡的数量大小均随季节呈周期性变化。

5 ~ 7 月，婚刺消失，表皮薄而光滑。角质层由 2 ~ 3 层细胞构成，呈波纹状排列，较平缓。颗粒细胞的胞核直径约 5 μm。真皮乳头较少，婚腺的腺泡间有黑色素细胞分布（图 1）。婚腺腺泡直径 80 ~ 120 μm，腺泡腔较大，腺细胞排列规则，细胞质较少，细胞核位于基底部。

8 月，表皮厚 40 ~ 80 μm，由 4 ~ 10 层细胞构成，表面突起顶端钝圆。突起深层的颗粒细胞体积较大，呈同心圆排列。两突起之间形成凹陷，其深层的颗粒细胞较小，胞核直径约 5 μm。婚腺腺泡直径可达 260 μm（图 2）。

9 月，表皮厚 40 ~ 100 μm，由 5 ~ 12 层细胞构成。表皮突起内的颗粒细胞体积更大，胞核直径7 ~

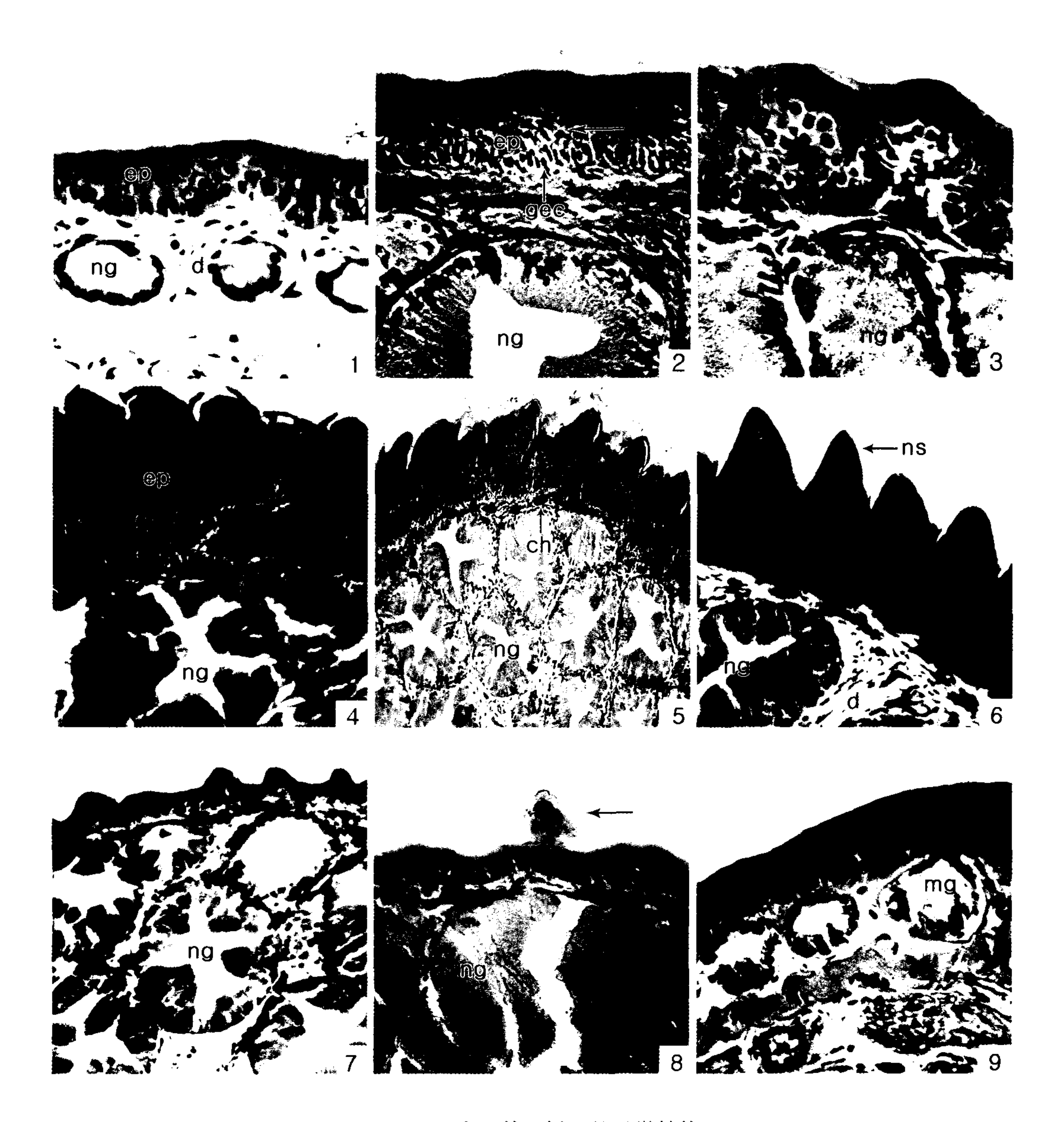


图 1—9 中国林蛙婚垫的显微结构

Figs. 1－9 Nuptial pad microstructures in Rana chensinensis

grc：颗粒细胞（Granular cell）；gec：生发细胞（Germinal cell）；gc：腺细胞（Gland cell）；ng：婚腺（Nuptial gland）；mg：粘液腺（Mucous gland）；ep：表皮（Epidermis）；d：真皮（Dermis）；ns：婚刺（Nuptial spine）；ch：色素细胞（Chromatophores）。

1. 6月，婚垫表皮薄且光滑，婚腺腺泡较小（In Jun, thin and smooth epidermis of nuptial pad, nuptial glands being small）×160；
2. 8月，婚垫表皮增厚，颗粒细胞清晰可见（In Aug, thickened epidermis of nuptial pad, obvious granular cell）×120；
3. 9月，表皮突起钝圆（In Sep, obtuse epidermis protuberance）×160；
4. 10月，锯齿状婚刺形成（In Oct, forming indented epidermis protuberance）×76；
5. 11月，色素细胞明显，婚刺排列规则（In Nov, obvious chromatophores, regular arranging nuptial spines on nuptial pad's surface）×76；
6. 12月，婚刺和婚腺（In Dec, nuptial spines and nuptial glands）×120；
7. 3月，婚刺数量减少（In Mar, the number of indented nuptial spines diminution）×76；
8. 4月，箭头示脱落的颗粒细胞小体（In Apr, arrow showing granular cells globule detaching from epidermis surface）×120；
9. 11月，雌蛙前肢第一指的皮肤（In Nov, skin of the foreleg region in female）×120。

8 μm。真皮乳头增多。婚腺腺泡直径达 340 μm，数量增多（图 3）。

10月，表皮厚 110～160 μm。表皮突起顶端尖锐，呈锯齿状排列，形成婚刺。个别突起从表面脱落（图 4）。婚腺腺泡直径达 360 μm，数量最多。

11月至翌年 2月，婚刺尖锐，突起顶端和边缘

的细胞较小，中央的颗粒细胞较大，胞核直径达 10 μm。部分突起的角质层将颗粒细胞包裹，形成球状颗粒，有脱落趋势（图 5，6）。婚腺腺泡直径为 210～350 μm，数量无变化。

3月，婚刺脱落明显，脱落处的表皮最外层由角质细胞覆盖，表皮变薄，残留突起圆钝（图 7）。个别突起从基部断裂。婚腺腺泡细胞内胞质较多，胞核位于基底部。

4月，婚刺减少，突起脱落后的表皮薄而光滑（图 8）。残留婚刺之间的间距较大。腺细胞胞质较 3 月少。婚腺腺泡直径为 230 μm。

观察 5、7、9 和 11 月雌性林蛙前肢第一指皮肤的显微结构，表皮也由基底层、颗粒细胞层和角质层构成，表皮较薄，表面没有随季节变化的突起。真皮乳头较雄性少，真皮中有粘液腺，但腺体数量较少，腺细胞不发达（图 9）。

2.2 婚垫内生发细胞、颗粒细胞和腺细胞中 T 的免疫反应

T 阳性反应在胞质或/和胞核内，着色程度由浅黄至棕黄色，空白对照无阳性反应。从 5 月到翌年 4 月，生发细胞、颗粒细胞和腺细胞均呈 T 阳性反应，反应强度显现出由弱到强，再减弱的变化趋势（表 1）；5～7 月，生发细胞和腺细胞呈弱阳性反应，为浅黄色，强度变化不明显（图 10）；8～9 月，颗粒细胞和腺细胞中，呈 T 强阳性反应，为棕黄色（图 11）；10 月，颗粒细胞中，T 阳性反应明显，但强度减弱（图 12）；11 月至翌年 2 月，三类细胞中均有 T 阳性反应，强度逐渐减弱（图 13，14）；3～4 月，T 阳性反应继续减弱（图 15）。

2.3 婚垫内生发细胞、颗粒细胞和腺细胞中 AR 的免疫反应

AR 阳性反应也在胞质和胞核内，着色程度由浅黄色至棕黄色，空白对照无阳性反应。从 5 月到翌年 4 月，在生发细胞、颗粒细胞和腺细胞中均有 AR 阳性反应，强度随月份发生明显变化（表 2）；5～7 月，三类细胞呈 AR 弱阳性反应，为浅黄色，强度呈增强趋势（图 16）；8～9 月，颗粒细胞、生发细胞和腺细胞呈棕黄色，为强阳性（图 17）；10 月，颗粒细胞、生发细胞和腺细胞染为黄色，强度减弱（图 18—19）；11 月，颗粒细胞中强度明显减弱；11 月到翌年 2 月，颗粒细胞、生发细胞和腺细胞中强度逐渐降低，阳性细胞数量减少（图 20—22）；3～4 月，颗粒细胞和生发细胞呈 AR 弱阳性反应，为浅黄色（图 23）。

表 1 中国林蛙婚垫颗粒细胞、生发细胞、腺细胞 T 阳性反应的灰度值

Tab. 1 Gray level of T positive reaction in granular cells, germinal cells and gland cellsin nuptial pad of *Rana chensinensis* (mean ± *SE*)

月份 Month	生发细胞 Germinal cells	颗粒细胞 Ganular cells	腺细胞 Gland cells
5月 May	128.95 ± 2.86	110.62 ± 2.62	122.27 ± 4.42
6月 Jun	121.92 ± 3.19	107.02 ± 1.65	118.22 ± 3.95
7月 Jul	111.07 ± 5.78	106.23 ± 4.16	113.32 ± 4.88
8月 Aug	94.15 ± 3.40*7	80.63 ± 3.32*7	95.43 ± 2.18*7
9月 Sep	92.72 ± 3.15	77.15 ± 1.86	88.33 ± 2.17
10月 Oct	96.13 ± 2.27	92.63 ± 1.05*9	97.70 ± 3.13
11月 Nov	102.50 ± 2.85	98.77 ± 2.53	101.05 ± 2.02
12月 Dec	105.58 ± 3.10*9	104.27 ± 2.56	109.93 ± 2.44*9
1月 Jan	104.82 ± 1.90	106.90 ± 3.03*10	111.05 ± 4.88
2月 Feb	110.93 ± 3.19	105.25 ± 3.68	114.27 ± 3.44
3月 Mar	124.72 ± 1.50*2	108.78 ± 6.26	117.50 ± 3.89
4月 Apr	130.55 ± 2.90	119.88 ± 2.27*2	121.67 ± 3.73

表中右上角的序号表示与之相应的月份相比，有极显著差异（The number at top right corner of mean ± *SE* denote significantly different from this month group）。
$n = 6$, * $P < 0.01$ (ANOVA-LSD).

3 讨 论

许多蛙类雄性成体都具有婚垫，婚垫的发育具有雄激素依赖性。施加外源性雄激素可使越冬中的豹蛙婚垫表皮和真皮增厚，形成角质化表皮突起，并使婚腺细胞肥大，腺腔膨大，细胞质中分泌物堆积（Thomas & Licht，1993）。食用蛙（*R. esculenta*）的皮肤和婚腺内分布有 AR（Delrio & d'Istria，1973；d'Istria et al，1975；Chieffi et al，1975）；豹蛙的婚垫表皮和婚腺内也分布有AR(Emerson et al，

表 2 中国林蛙婚垫颗粒细胞、生发细胞、腺细胞 AR 阳性反应灰度值

Tab. 2 Gray level of AR positive reaction in granular cells, germinal cells and gland cells in nuptial pad of Rana chensinensis (mean ± *SE*)

月份 Month	生发细胞 Germinal cells	颗粒细胞 Granular cells	腺细胞 Gland cells
5月 May	120.13 ± 3.16	117.75 ± 2.24	123.85 ± 2.31
6月 Jun	116.08 ± 2.56	114.03 ± 2.82	119.00 ± 3.36
7月 Jul	112.50 ± 3.07	106.25 ± 2.28	113.17 ± 2.58
8月 Aug	66.17 ± 1.55*7	66.50 ± 1.37*7	66.47 ± 1.71*7
9月 Sep	69.58 ± 2.35	59.97 ± 2.19	71.97 ± 2.36
10月 Oct	80.92 ± 1.90*8	71.18 ± 2.50*9	81.50 ± 2.70*8
11月 Nov	85.45 ± 3.39	83.23 ± 3.00*10	85.80 ± 2.81
12月 Dec	87.38 ± 3.26	76.22 ± 3.35	83.22 ± 4.85
1月 Jan	89.75 ± 2.21	89.99 ± 2.09	89.72 ± 3.56
2月 Feb	97.83 ± 5.30*10	94.33 ± 2.52*11	90.43 ± 1.97
3月 Mar	103.78 ± 2.00	103.07 ± 1.84	101.93 ± 1.36*10
4月 Apr	117.19 ± 5.44*3	111.31 ± 4.93*2	110.32 ± 5.77

表中右上角的序号表示与之相应的月份相比，有极显著差异（The number at top right corner of mean ± *SE* denote significantly different from this month group）。

$n = 6$, * $P < 0.01$ (ANOVA-LSD).

1999)。本实验结果显示，中国林蛙婚垫内 T 和 AR 在颗粒细胞、生发细胞和婚腺细胞中的定位具有一致性；T 与 AR 阳性反应灰度值的变化趋势基本一致，即 5～7 月阳性反应较弱，但呈增强趋势；8～9 月阳性反应最强；10 月开始减弱；11 到翌年 2 月阳性反应逐渐降低；3～4 月明显降低。婚垫内 T 和 AR 的变化与婚垫显微结构的周期性变化规律相吻合。与此相对应，5～7 月婚垫的表皮厚度、婚腺腺腔大小增长缓慢；8～9 月婚垫表皮厚度明显增加，婚腺数量明显增多；10 月婚刺形成，呈锯齿状排列，婚腺腺上皮增厚，婚腺结构及其数量基本稳定；11 到翌年 2 月婚刺和婚腺的结构无明显改变；3～4 月婚刺消失、婚腺腺上皮退化。这些结果表明，T 与 AR 的结合，调节中国林蛙婚垫的形成和消退。

中国林蛙的精子发生属于非连续型，精巢系数的变化与精子发生的活动周期一致。生精周期划分为 5 个时期（Yang & Zhang，2005）。对中国林蛙婚垫组织结构的观察发现，婚垫的显微结构也随季节呈现周期性变化。5～7 月精巢系数正处于最小的Ⅰ期，精巢内 T 分泌活动较弱，婚垫中诱导三类细胞增生的 T 水平较低，所以呈现出表皮薄而光滑、婚腺数量少、腺泡腔较大、腺细胞较小等特征；8～9 月为精巢系数显著增加的Ⅱ期，精巢内 T 分泌旺盛，T 与 AR 结合诱导婚垫的生发层细胞增生，颗粒细胞数量增多，表皮增厚，并且婚腺数量增多，腺泡直径变大；9～10 月正值精巢系数略有下降的Ⅲ期，精巢内仍有 T 分泌，T 在婚垫的进一步发育中发挥作用，使婚垫表皮突起由钝圆变得尖锐，形成婚刺，且婚腺腺泡数量最多；11 月到翌年 2 月，林蛙处于冬眠状态，精巢系数无明显变化Ⅳ期，T 分泌活动微弱，生发细胞不再增生，婚刺和婚腺变化不明显；3～4 月处于精巢系数显著下降的 V 期，T 与 AR 在颗粒细胞、生发细胞和婚腺细胞中阳性反应最低，此时婚刺有脱落现象，脱落的角质细胞包裹着颗粒细胞小体。

上述结果表明，中国林蛙婚刺的形成是生发细胞增生、颗粒细胞数量增多和体积增大所致，其消退是角质细胞包裹着颗粒细胞小体脱落所致。婚垫表皮突起的形成和消退，婚腺显微结构的改变均与 T 和 AR 的变化相关。这与施加外源性雄激素所引发的豹蛙婚垫显微结构的改变基本一致。进一步确证了精巢产生的 T 在婚垫中呈现周期性变化（Lynch & Blackburn，1995），导致婚垫显微结构随季节而改变。由于婚垫的形成与消退受 T 调控，T 同时还调控精子发生进程，影响精巢系数的变化。所以，婚垫发育的变化周期与非连续性精子发生的精巢周期在发育程度上具有一定的相关性，即婚垫的形态特征可间接反应精巢的发育状况。

无论雄性蛙还是雌性蛙，施加外源性雄激素均能诱导婚垫的发育（Kelly & Pfaff，1976）。此外，注射 $17\beta\text{-}E_2$ 导致蓝点蛙和虎纹蛙（*R. tigrina*）婚垫的退化（Saidapur & Nadkarni，1975）。雌性虎纹蛙拇指皮肤中同样有 AR 表达（Emerson et al，1999）。而中国林蛙雌性前肢第一指无婚垫形成，皮肤显微结构不随季节而发生变化。据此推测雌性林蛙血清中 T 含量低、雌激素含量高是其直接原因。

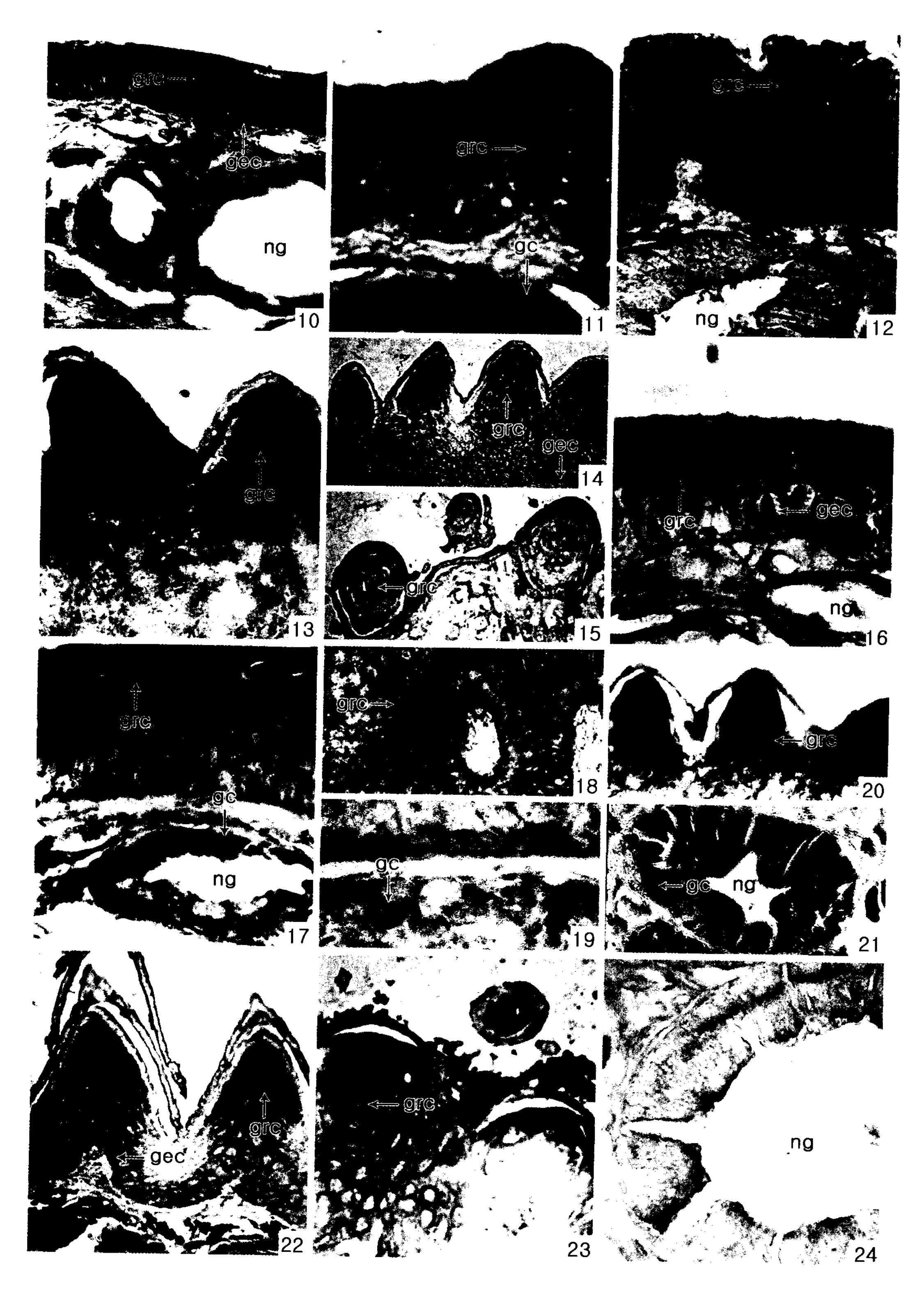


图 10—24　中国林蛙婚垫中 T 与 AR 的免疫细胞化学定位

Figs. 10－24　Immunocytochemistry distribution of T and AR in the nuptial pad of Rana chensinensis

10—15. T 阳性反应（T positive reaction）：

10. 6 月的生发细胞和婚腺腺细胞（In Jun, germinal and gland cells）×160；

11. 8 月的颗粒细胞和婚腺腺细胞（In Aug, germinal and gland cells）×310；

12. 10 月的颗粒细胞（In Oct, granular cells in nuptial spines） ×160；
13. 12 月的颗粒细胞（In Dec, granular cells） ×160；
14. 2 月的颗粒细胞和生发细胞（In Feb, granular and germinal cells） ×160；
15. 4 月的颗粒细胞（In Apr, granular cells） ×160；
16—23. AR 阳性（AR positive reaction）：
16. 6 月的颗粒细胞和生发细胞（In Jun, granular and germinal cells） ×310；
17. 8 月的颗粒细胞和婚腺腺细胞（In Aug, granular and gland cells） ×310；
18. 10 月的颗粒细胞和生发细胞（In Oct, granular and germinal cells） ×310；
19. 10 月的婚腺腺细胞（In Oct, gland cells） ×310；
20. 12 月的颗粒细胞核（In Dec, granular cells） ×160；
21. 12 月的婚腺腺细胞（In Dec, gland cells） ×160；
22. 2 月的颗粒细胞和生发细胞核（In Feb, granular and germinal cells） ×160；
23. 4 月的颗粒细胞（In Apr, granular cells） ×160；
24. 10 月的婚腺空白对照（In Oct contradistinguish section of nuptial pad） ×160。

参考文献：

Delrio G, d'Istria M, Valentino MA. 1975. Appearance of sex hormone receptors in frog (*Rana esculenta*) tadpole skin during metamorphosis [J]. *Experientia*, **31** (8): 989 - 990.

Delrio G, d'Istria M. 1973. Androgen receptor in the thumb pads of *Rana esculenta* [J]. *Experientia*, **29**: 1412 - 1413.

D'Istria M, Delrio G, Chieffi G. 1975. Receptors for sex hormones in the skin of the amphibian [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **26** (2): 281 - 283.

Emerson SB, Greig A, Carroll L, Prins GS. 1999. Androgen receptors in two androgen-mediated, sexually dimorphic characters of frogs [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **114** (2): 173 - 180.

Epstein MS, Blackburn DG. 1997. Histochemistry of androgen-induced secretions of nuptial pads in the leopard frog, *Rana pipiens*, with notes on nuptial gland function and evolution [J]. *Can J Zool*, **75**: 472 - 477.

Kelly DB, Pfaff DW. 1976. Hormone effects on male sex behavior in adult South African clawed frogs, *Xenopus laevis* [J]. *Horm Behav*, **7** (2): 159 - 182.

Kurabuchi S. 1993. Fine structure of nuptial pad surface of male ranid frogs [J]. *Tissue Cell*, **25** (4): 589 - 598.

Lynch L, Blackburn DG. 1995. Effects of testosterone administration and gonadectomy on nuptial pad morphology in overwintering male leopard frogs, *Rana pipiens* [J]. *Amphibia-Reptilia*, **16**: 113 - 121.

Saidapur SK, Nadkarni VB. 1975. The effect of 17β-estradiol acetate on the testis and thumb pad of *Rana cyanophlyctis* (Schn.) and *Rana tigrina* (Daud.) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **27** (3): 350 - 357.

Thomas EO, Licht P. 1993. Testicular and androgen dependence of skin gland morphology in the anurans, *Xenopus laevis* and *Rana pipiens* [J]. *J Morphol*, **215**: 195 - 200.

van Wyk JH, Pool EJ, Leslie AJ. 2003. The effects of anti-androgenic and estrogenic disrupting contaminants on breeding gland (nuptial pad) morphology, plasma testosterone levels, and plasma vitellogenin levels in male *Xenopus laevis* (African clawed frog) [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, **44** (2): 247 - 256.

Yang C, Zhang YH. 2005. Annual variation of the testicular microstructures of *Rana chensinensis* in the north slope of Qinling mountains [J]. *Chinese J Zoology*, **40** (3): 81 - 85. [杨 纯，张育辉. 2005. 秦岭北坡中国林蛙精巢显微结构的年周期变化. 动物学杂志, **40** (3): 81 - 85.]

Ye CY, Fei L, Hu SQ. 1993. Rare and Economic Amphibians of China [M]. Chengdu: Sichuan Publ. House Science and Technology, 212 - 215. [叶昌媛，费 梁，胡淑琴. 1993. 中国珍稀及经济两栖动物. 成都：四川科学技术出版社，212 - 215.]